

《使用経験》

固相法によるインスリンラジオイムノアッセイ法の検討

板津武晴* 伊藤光泰*

緒言

1959年, Bersonらによりインスリンの radioimmunoassay 法が確立されて以来¹⁾, 現在, 広く臨床に用いられている。本法において抗体と結合したインスリンと遊離インスリンを分離する方法は種々考案されている^{2)~9)}。現在は二抗体法による分離法が広く行われているが, 血清中の抗原抗体反応阻害特質の存在による影響, 大量の第二抗体が必要なため高価になる等々の問題点が指摘されている^{10)~13)}。

今回, 我々は抗インスリン抗体を Immunoabsorbent である Sephadex に結合させたいわゆる固相法によるインスリン測定法 (Pharmacia で開発された Phadebas Insulin Test) を入手する機会を得たので, 本法の基礎的並びに臨床的検討を行った。

1. Kit の内容及び測定手技

1) 試薬の調製

①緩衝液 (緩衝用物質を蒸留水 200ml に溶解する。)

②Sephadex-インスリン抗体-Complex (緩衝液 100ml に溶解し, 添加開始 15~30 分前から添加が終るまで, Magnetic Stirrer で攪拌し続ける)

③標準インスリン (蒸留水 4 ml に溶解し, 320 $\mu\text{U}/\text{ml}$ の溶液を調製し, これを緩衝液で 5, 10, 20, 40, 80, 160 $\mu\text{U}/\text{ml}$ の各濃度に希釈して, イン

*名古屋大学医学部第1内科

受付: 50年5月6日

採用: 50年12月4日

別刷請求先: 名古屋市昭和区鶴舞町65 (〒466)

名古屋大学医学部第1内科

板津武晴

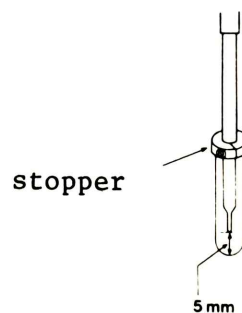


Fig. 1 Special needle with stopper for aspiration of supernatant

スリン標準液として使用する)

④ I^{125} インスリン 3 μCi (比活性 333mCi/mg) を緩衝液 10ml で溶解する。

2) 測定手技

「10×70mm の栓付きプラスチックチューブに標準インスリン液又は血清サンプル 0.1ml, I^{125} インスリン液 0.1ml, Sephadex-インスリン抗体-Complex 懸濁液 1.0ml を入れる。プラスチックチューブに栓をし, Vertical Rotator にて毎分 18 回転にて回転振盪し, 室温下にて約 24 時間インキュベートする。インキュベーション終了後, 2000 r.p.m. で 2 分間遠沈し, プラスチックチューブの栓をとり, 再び 2000 r.p.m. で 5 分間遠沈する。上清を管底から 5 mm の深さまで吸引除去する (Fig. 1)。次いで, 分注器にて生理的食塩水 2 ml ずつ加え, 同一条件で遠沈し上清を上記の如く吸引除去する。この洗浄操作を 3 回繰り返した後, 沈澱物の比放射能をウェル・タイプシンチレーションカウンターで測定する。非標識インスリン濃度 “0” の比放射能に対する比放射能の%を計算し, 標準曲線を描き, 各検体のインスリン値を読

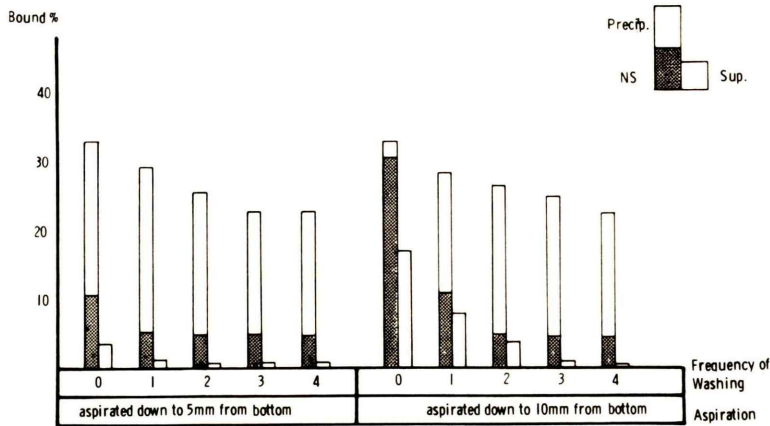


Fig. 2 Effect of washing and aspiration on B % at 48 hrs incubation.
 Precip. : B % of the precipitant (open column)
 NS : B % of nonspecific binding to tube (solid column)
 Sup. : B % of the supernatant (small, open column)

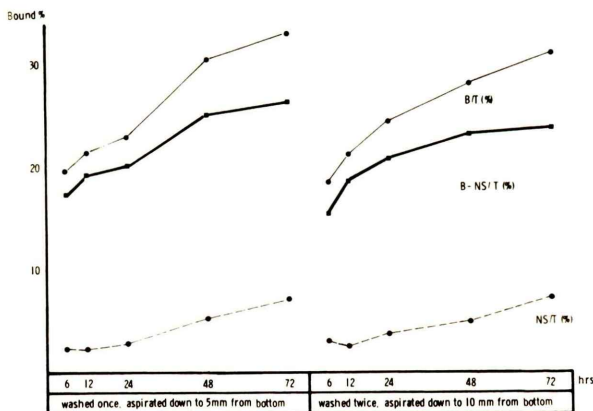


Fig. 3 Effects of incubation and washing on B%.
 B/T (%) : B % of the precipitant and the supernatant after washing once or twice
 NS/T (%) : B % of nonspecific binding to tube
 B-NS/T (%) : B/T - NS/T (%)

む。」と説明書に指示されている。

2. 血清サンプル

空腹時に採血し、遠沈により血清分離後測定まで、 -20°C にて冷凍保存した。

3. 従来の二抗体法によるインスリン測定は、ダイナボット社製インスリンキットによった。

成績

1. 基礎的検討

1) 洗浄方法の検討

B, F の分離において Fig. 1 に示す如く, Stopper をつけた吸引針で上清を管底から 5 mm まで吸引した場合 (以下「5 mm 吸引」と略) と、10mm まで吸引した場合 (以下「10mm 吸引」と略) との Bound % (B% と略) に及ぼす影響及びそれぞれの洗浄回数の B% に及ぼす影響を観察した。Fig. 2 にみる如く、48 時間のインキュベーションにおける洗浄前及び 1 ~ 4 回の洗浄の際の B% は、洗浄回数が増すに従って「5 mm 吸引」では 32.7% から 22.5% へと減少し、「10mm 吸引」では 32.7% から 22.2% へと漸減した。一方、 I^{255} インスリンの非特異的結合 (NS と略) の放射能は「5 mm 吸引」では洗浄 1 回以上で、「10mm 吸引」では洗浄 2 回以上で、一定の%を示した。以上の事から「5 mm 吸引」では 1 回洗浄が、又「10mm 吸引」では 2 回洗浄が必要と考えられた。

2) インキュベーション時間の検討

まず「5 mm 吸引」で 1 回洗浄する方法と、「10mm 吸引」で 2 回洗浄する方法とで、B% に及ぼす各インキュベーション時間の影響を比較検討

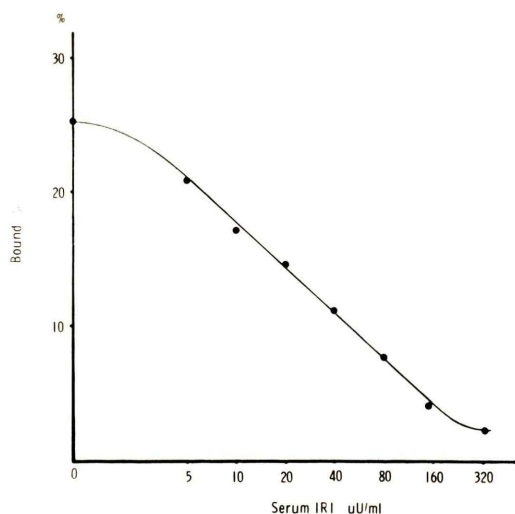


Fig. 4 Standard Curve

した (Fig. 3). 前者の方法では, 沈澱物の放射能はインキュベーション時間の増すごとに19.7% (6時間) から33.4% (72時間) へと増加し, 後者では24.4% (6時間) から30.8% (72時間) へと増加した. これと対応して, NSの%も増加した. 従って, 沈澱物の比放射能からNSの比放射能を減じたものを総放射能に対するB%とすると, 48時間と72時間におけるB%はほとんどみるべき差異を認めず, 48時間のインキュベーション時間が適当であると考えられた. 以上の結果より, 我々は操作が簡便でしかも安定したB%が得られる「5mm吸引」にて1回洗浄する方法を採用した.

3) 標準曲線

48時間インキュベーションにおける標準曲線を示したのが Fig. 4である. 各放射能のNSを減じた沈澱物の比放射能の総放射能に対するB%で表現した. 同一Batchのキットで連続3回測定した時の各インスリン濃度におけるB%は極めて近似した値を示し, 本キットの標準曲線は安定したものと考えられた.

4) 再現性

A~Eの5検体をそれぞれ5重測定し, 本法における同一assay内の再現性を検討した.

Table 1 Reproducibility

The data represent the mean±S.E.M. in pentaplicated value.

Sample	Number	Mean±S.E. (uU/ml)	C.V. (%)
A	5	9.6 ± 1.1	11.4
B	5	18.7 ± 2.7	14.4
C	5	54.4 ± 5.3	9.7
D	5	94.6 ± 7.1	7.5
E	5	7.3 ± 1.0	13.6

Table 2 Recovery

The recovery study was performed on 6(A-F) samples.

Sample	Original Value of IRI μ U/ml	Added Insulin 0.1ml (μ U/ml)	Assayed value of IRI μ U/ml	Recovery %
A	3.7	10	13.6	99
B	24.3	10	34.3	100
C	30.5	20	48.0	90
D	14.5	40	58.0	108.7
E	30.0	80	140.0	137.5
F	4.6	80	117.5	140.0

Table 1に示すごとく, 変異係数はいずれも14.4%から7.5%の間の数値を示し, 良好な再現性を示した. 又, assay間の再現性を検討するため同一の8検体について, 異った測定系列でしかも3ヶ月後にインスリン値を測定し, それぞれの値の差異を観察したが, インスリン値の低い血清では, 測定値に若干の差異が認められたが, 全体としてはほぼ近似した値を示し, 相関係数も0.98と良好な結果を得た.

5) 回収率

種々の血清に標準インスリン液10~80 μ U/mlの既知濃度の液を添加し, その回収率を検討した (Table 2). インスリン濃度10~40 μ U/mlの回収率は90~108%と良好であったが, 80 μ U/mlとインスリン高濃度では, その回収率はそれぞれ137, 140%とやや高い傾向を認めた. これに対して, インスローマの血清に標準インスリン液20 μ U/ml, 5 μ U/mlを添加した際の回収率は, 各々87%, 70%であり低い傾向を認めた. 又, インス

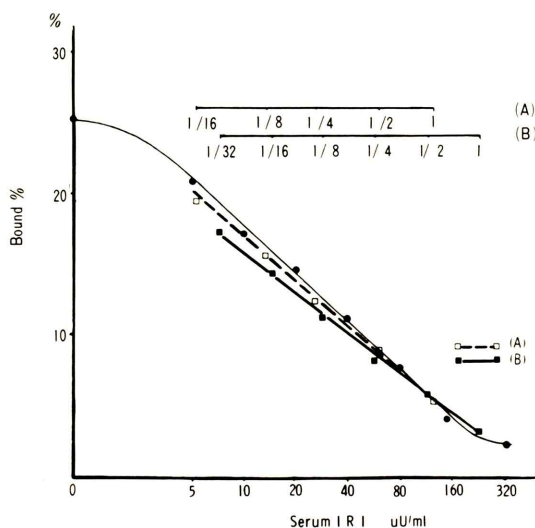


Fig. 5 Dilution Curve

Dilution curve of two high insulin samples (sample A and B) show the parallelism with the standard curve.

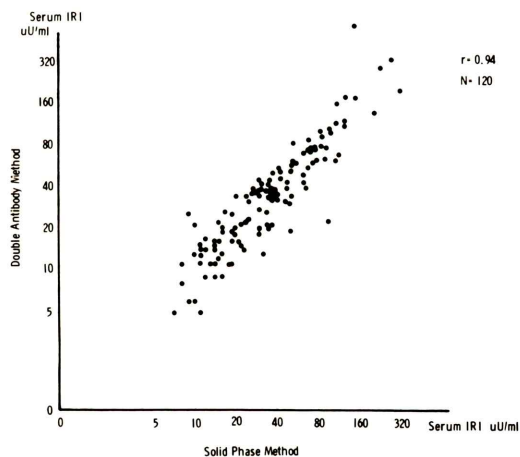


Fig. 6 Correlation between serum IRI value in double antibody method and those in solid phase method. $P < 0.01$

リン治療患者の血清でインスローマの場合と同様の回収率をみると0%とほとんど回収されず、標準インスリン液 $80\mu\text{U/ml}$ を添加してもわずか7.5%の回収率を認めたにすぎない。このような血清では、インスリン結合蛋白が存在すると考えられた。

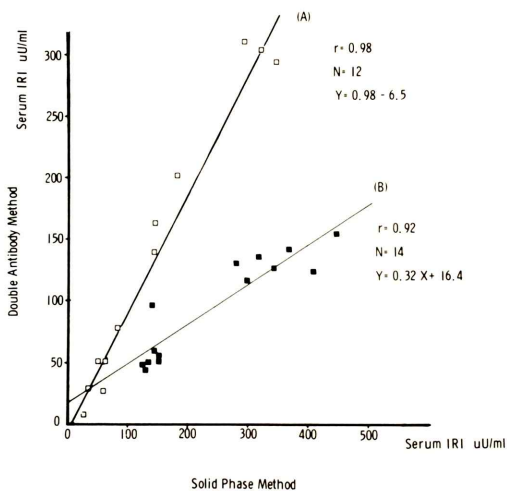


Fig. 7 Correlation between serum IRI value in double antibody method and those in solid phase method (A) Patient with insuloma (open squares) (B) Diabetic treated with insulin (solid square)

6) 希釈曲線

インスリン濃度の高値を示す血清を希釈した際のB%の変動を2検体について観察した。

Fig. 5にみるごとく、希釈曲線は緩衝液で作製した標準曲線に一致し、本法が内因性インスリンの変動を適確に示す指標たり得ることが確かめられた。

7) 二抗体法との比較

100以上の検体について、本法と二抗体法とによるparallel assayを行い、それぞれの値を比較検討した。Fig. 6にみる如く、両法による測定値は極めて良好な相関関係($r=0.94$)を示した。ただFig. 7にみるごとく、本法で高インスリン値を示すイスローマの症例では、二抗体法でも同様のインスリン値を示し、相関関係も更に良好($r=0.98$)であるのに対し、長年インスリン治療をうけた症例で血清中にインスリン結合蛋白が想定される場合には、本法におけるインスリン測定値は、二抗体法に比較しより高くなり、両者の測定値の間に解離を認めた。

8) 血清中のインスリン結合蛋白の有無について検討。

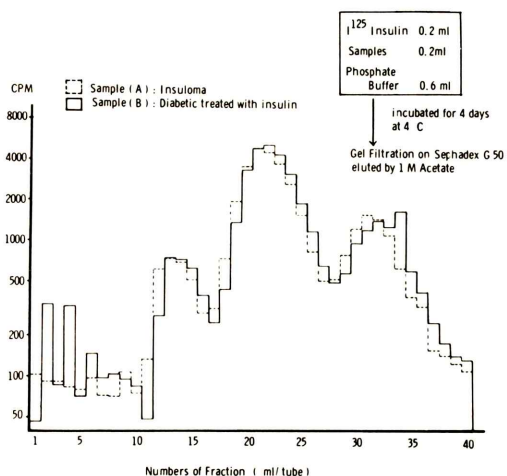


Fig. 8 Gel filtration of 125 I-insulin on Sephadex G-50 about samples of a patient with insuloma (A) and adiabetic patient treated with insulin (B).

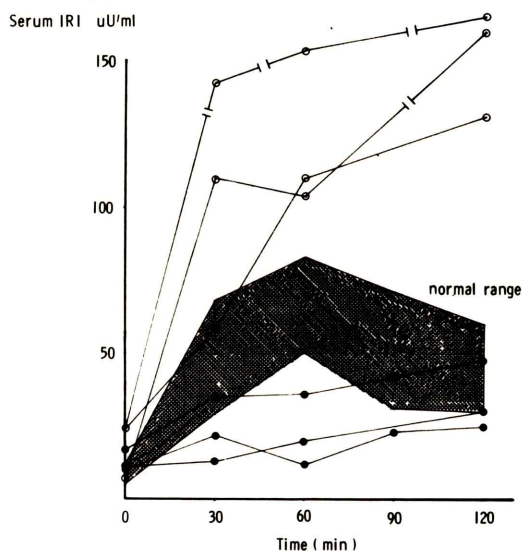


Fig. 9 Changes of serum IRI levels in 100g OGTT. The open circle shows a high response of insulin secretion to oral glucose load. The solid circle shows a low response of insulin secretion. The shaded area represents the normal range of insulin secretion in normal subjects.

我々は、血中にインスリン結合蛋白が存在するかどうかをみるため、Fig. 8に示す如く、血清0.2mlに、本法に用いられる I^{125} インスリン液0.2mlと共に4°C下4日間インキュベートした後、

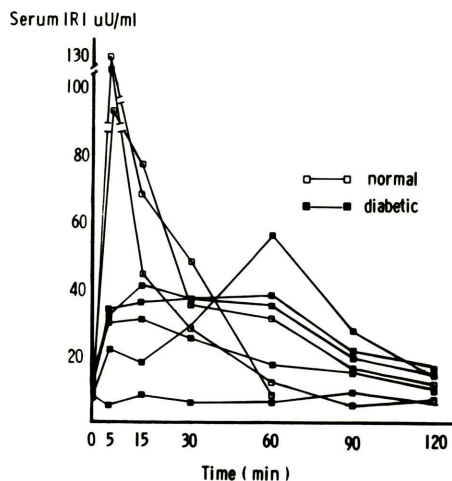


Fig. 10 Changes of serum IRI levels in 20g glucose i.v. GTT. The open squares represent normal subjects and the solid squares represent subjects with diabetic pattern in 100g OGTT.

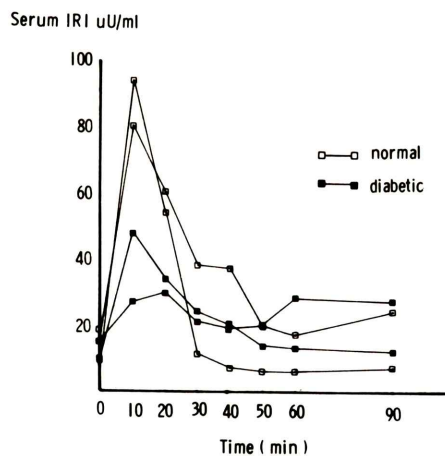


Fig. 11 Changes of serum IRI levels in 1g tolbutamide i.v. test. The open squares represent normal subjects and the solid squares represent subjects with diabetic pattern in 100g OGTT.

その反応液を Sephadex G-50 の column (1 cm×40cm) に添加、ゲル濾過を行い、各フラクションの放射能をみた。破線で示すインスローマの血清では void volume に相当する初めの 2~3 ml の

フラクションに放射能を認めないのに対し、実際に示すインスリン治療患者の血清において、若干の放射能を認めた。このことは、 I^{125} インスリンと結合する何らかの蛋白部分と考えられ、前記の回収率の結果並びに本法と二抗体法との測定値の間にみられた解離を説明するものと思われる。

2. 臨床的検討

1) 正常値

15人の健常人の空腹時血中インスリン値の平均(±SE)は、 $7.0 \pm 1.9 \mu\text{U/ml}$ であった。

2) 100g 糖経口負荷時の血中インスリン値 (Fig. 9)

100g 糖経口負荷時耐糖能異常を示した例は、インスリン低反応を伴っているが、肥満、クッシング症候群を含む3例は(白丸で示す)インスリン過剰反応を示した。

3) 20g 糖静注負荷時の血中インスリン値 (Fig. 10)

100g 糖経口負荷時に、耐糖能曲線が正常型を示した例(白四角)は、5分以内に速かに上昇するインスリン反応を示すのに対し、耐糖能曲線が糖尿病型を示した例(黒四角)は、頂値に達するのは15分から60分と遷延しかつ低値であった。

4) 1g トルブタミド静注負荷時の血中インスリン値 (Fig. 11)

100g 糖経口負荷時の耐糖能曲線が正常型を示した例(白四角)では、10分で $80 \mu\text{U/ml}$ 以上の頂値を示すのに対し、糖尿病型を示した例(黒四角)では、頂値 $50 \mu\text{U/ml}$ 以下の低反応を示した。いずれも、二抗体法での測定成績とほぼ同様の傾向を示し、本法におけるインスリン測定は臨床的に十分使用し得ると考えられた。

考 按

I^{125} インスリンの非特異的吸着(NS)の比放射能を減少し得るとの予想の下に固相法における分離法として3回洗浄が必要とされて来た^{12)~17)}。

この洗浄操作は、繁雑であり^{18)~20)}又測定感度を低下せしめるものとも考えられたので、この3回洗浄が必要であるか否かについて検討した。「5mm吸引」では、洗浄を繰り返すことにより、上清、沈澱物の比放射能が減少する一方、NSの比

放射能は一定に保たれる傾向にあり、又インキュベーション時間が長い程そのB%も増加している。これは、プラスチックチューブへの I^{125} インスリンの非特異的吸着及び洗浄後の残存が十分に考えられる。「10mm吸引」では、NSのB%は明らかに多く、それだけ洗浄の繰り返しが必要であるといえる。これに対し、「5mm吸引」では、Sephadexの一部を上清として吸引除去する危険性があり、洗浄を繰り返すことにより、その危険性が増すものと考えられる。従って、非結合 I^{125} インスリンの残存をできるだけ少なくし、B%としてバラツキを少なくすることにもなり、そしてより簡便な操作となると考え、「管底から5mmの高さまで上清を吸引し、1回洗浄する」方法を採用した。同時に、本法におけるB%は、Fig. 3にみるごとくインキュベーション時間が長くなるに従って増加する傾向を示すが、48時間インキュベーションでの標準曲線はFig. 4のごとく、良好なdisplacement curveを描いている。本法での再現性、回収率、希釈曲線は、いずれも満足すべきものであった。二抗体法との比較においても満足すべき相関が得られたが、若干の血清においては、両者の値に相違の大きなものがあり、本法では二抗体法に比してより高いインスリン値を示した。各 assay system に用いる標準インスリンや抗体による違い、あるいは I^{125} インスリンの変化などの他に、血清中に含まれるインスリン結合蛋白が I^{125} インスリンとの結合性を増しているためとも思われ^{21)~33)}、特に本法においては、Sephadex—インスリン抗体—Complex との I^{125} インスリンの結合性に何らかの変化を来たすことが示唆される。これら例外的な血清を除けば、本法は簡便で、安定なすぐれた測定法として一般的に使用しうる方法と思われる。

結 語

固相法によるインスリン測定キットについて従来の方法と比較しながら検討を行った。その結果、基礎的条件もほぼ満足され、より簡便なものとするために、「洗浄1回、管底より5mmの深さま

で吸引する」方法が推奨される。そしてその成績からも十分臨床的に有用であると考えられる。なお、インスリン結合蛋白の存在が疑われる血清では、二抗体法に比しよりインスリン高値となる可能性が示唆された。

謝 辞

Phadebas Insulin Test を提供していただいたシオノギ製薬に感謝いたします。

御指導、御校閲いただいた仁瓶禮礼博士に感謝いたします。

文 献

- 1) Berson S A & R S Yalow : Nature (Lond.) **184** : 1648, 1959
- 2) Yalow R S & S A Berson : J Clin Invest **39**:1157, 1960
- 3) Morgan G R & A. Lazarow : Diabetes **12** : 115, 1963
- 4) Hales C N & C J Randle : Biochem J **88** : 137, 1963
- 5) Genuth S, L.A.Frohman & H E Lebovitz : J Clin Endocr **25** : 1043, 1965
- 6) Grodsky G M & P H Forsham : J Clin Invest **39** : 1070, 1960
- 7) Herbert V, K S Lau, C W Gottlieb & S J Bleicher : J Clin Endocr **25** : 1375, 1965
- 8) Berson S A & R S Yalow : J Clin Invest **47** : 2725, 1968
- 9) Gordies E : Proc Soc Exp Biol Med **103** : 542, 1960
- 10) Morgan C R, R L Sorensen & M. Lazalow : Diabetes **13** : 579, 1964
- 11) 鎮目和夫, 熊原雄一編 : Radioimmunoassay **72**, 1970
- 12) 森下寿々枝, 黒田耕平, 市原紀久雄, 垂井清一郎, 島健二 : 最新医学 **27** : 1037, 1972
- 13) Kuzuya T & Salnoles E : Metabolism **13** : 493, 1964
- 14) Wide L & J Porath : Biophys Acta **130** : 257, 1966
- 15) Catt K, H.D. Niall, & G W Tragear : Biochem J **100** : 31, 1966
- 16) 井出健彦 : 臨床成人病 **2** : 209, 1972
- 17) 吉田秀雄, 前田徳雄, 服部宏, 飯田優, 河野勝之祐, 笹屋昌文 : 京府医大誌 **81** : 233, 1972
- 18) 安沢滝徳, 清水紀博, 本吉光隆 : Clinical Report 基礎臨床 **6** : 539, 1972
- 19) 西村ひろみ, 平田幸正 : Clinical Report 基礎臨床 **6**:1544, 1972
- 20) 鬼原彰, 白石正勝, 伊藤義智 : Clinical Report 基礎臨床 **6** : 1549, 1972
- 21) 中川昌一 : 糖尿病 **9** : 357, 1966
- 22) 平田幸正 : 代 謝 **3** : 252, 1966
- 23) 平田幸正, 石津汪, 大内伸夫他 : 糖尿病 **13** : 312, 1970
- 24) 吉川隆一 : 糖尿病 **13** : 372, 1970
- 25) 中川昌一 : ホルモンと臨床 **2** : 15, 1972
- 26) Berson S A & R S Yalow : J. Clin. Invest. **35** : 170, 1956
- 27) Berson S A & R S Yalow : Diabetes **13** : 247, 1964
- 28) Patterson R G Lucena R Metz & M Roberts : J Immunol **103** : 1061, 1969
- 29) Yagi Y, P Maier, D Pressman C E Arbesman, R E Reisman & A.R. Lenzner : J Immunol **90** : 760, 1963
- 30) Goldsmith S J, R S Yalow & S A Berson : Diabetes **18** (suppl. 1) : 341, 1969
- 31) Devey M, D Carter, C J Snderson & R R A Coomes : Lancet **2** : 1280, 1970
- 32) Yalow R S : Pharmacological Reviews **25** : 161, 1973
- 33) Yalow R S & S.A. Berson : Metabolism **22** : 703, 1973